

官庁出願

特許願 (II)

後記号なし

昭和50年 7月 4日

特許庁長官殿

1.発明の名称 コウゾシンド セイゾウホウ
高純度マルトースの製造方法

2.発明者

チバ イナゲヒル
住 所 千葉県千葉市稲毛東5丁目8番1号
コウキョウキョウエンセイブイフコウキョウキョウエンキョウシヨク
氏 名 工業技術院微生物工業技術研究所内
タカ サキ ヨシ ユキ
高崎 義 幸

3.特許出願人

チロダ カスミガセキ
住 所 東京都千代田区麹町1丁目3番1号
コウキョウキョウエンセイブイフコウキョウキョウエンキョウシヨク
氏 名 (114) 工業技術院長
マツ モト ケイ シン
松本 敬信

4.指定代理人

チバ イナゲヒル
住 所 千葉県千葉市稲毛東5丁目8番1号
コウキョウキョウエンセイブイフコウキョウキョウエンキョウシヨク
氏 名 工業技術院微生物工業技術研究所長
ミヅノ テル ノブ
御 園 光 信

方式
審査

特許

明 細 書

1.発明の名称

高純度マルトースの製造方法

2.特許請求の範囲

澱粉または液化澱粉を β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼで処理し、次にアスペルギルス属菌の生産する α -アミラーゼで処理することを特徴とする高純度マルトースの製造方法。

3.発明の詳細な説明

本発明は澱粉から純度の高いマルトースを製造する方法に関するものである。

従来、澱粉からマルトースを製造するには、液化澱粉を β -アミラーゼ及び α -1,6-グルコシダーゼで処理すればよいことはよく知られている。

そして、ここに使用する β -アミラーゼ(α -1,4-グルカンマルトヒドロラーゼ)は、麦芽、大豆に多く見出され、現在、工業的には、これら給餌のものが使用されているが、バチルス属細菌も同様の酵素を生産することが知られている。すなわち、1946年ニーンらは、バチルス・ポリミ

①9 日本国特許庁

公開特許公報

⑪特開昭 52-7487

⑬公開日 昭52.(1977) 1.20

⑫特願昭 50-82595

⑭出願日 昭50.(1975) 7.4

審査請求 未請求 (全6頁)

庁内整理番号

711049

⑫日本分類

360D231

⑫Int.Cl²

C12D13/00

キサ(Bacillus polymyxa)が、 β -アミラーゼを生産することを発見し[アーカイブ・オブ・バイオケミストリー(Archive of Biochemistry)第10巻、第41頁(1946年)]、また、1948年、ローズは、同菌株の生産する β -アミラーゼの酵素的性質について、より詳細に報告している[アーカイブ・オブ・バイオケミストリー(Archive of Biochemistry)第16巻、第349頁(1948年)]。その後、東原、岡田らも、バチルス・メガテリウムが β -アミラーゼを生産することを報告している[日本農芸化学会、昭和46年度大会講演要旨集第212頁、およびアミラーゼシンポジウム、第6巻、第39頁(1971)]が、この酵素もバチルス・ポリミキサの生産する β -アミラーゼと同じであることが報告されている(日本農芸化学会、昭和47年度大会講演要旨集第86頁)。

一方、ここに使用する α -1,6-グルコシダーゼについては、従来イソアミラーゼ、ブルナーゼとして多くの報告がある。即ち、イソアミラー

せは、丸尾、小林らにより酵母（丸尾文治、小林恒夫、日本農芸化学会誌、第23巻、第115頁および第120頁（1949年）など）にはじめて見出され、その後、属等植物（R-酵素とよばれている）やシュードモナス属細菌（特公昭45-16788）にも見出されている。更に最近、好熱性バチルス・ステアロサーモフィラスが、65～67.5℃に最適作用温度を有する高温性イソアミラーゼを生産することが報告されている。（日本農芸化学大会昭和47年度講演要旨集第88頁および特開昭48-91272）。また、ブルナーゼは、1959年、ベンダーによつてブルラリアブルランの生産する多糖類ブルランを加水分解する酵素として、エーロバクター・エーロゲネス（*Aerobacter aerogenes*）に見出され、ブルランの α -1,6グリコシド結合を加水分解してマルトトリオースを生成する〔*Biochem. Biophys. Acta.* 第36巻、第309頁（1959年）、および特公昭46-7559〕。この酵素はアミロペクチンやグリコーゲンなどの α -1,6グリコシド結合も

アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを同時に生産し、かつこの α -1,6-グルコシダーゼは全く新しい酵素であることを見出したのである。

そして、本発明者は、ここに見出したバチルス属が同時に生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを用いてマルトースの生産の研究を進めたところ、生成するマルトースにかなりの量でオリゴ糖が混在してその純度を低下せしめている問題に遭遇したのである。即ち、このバチルス属細菌の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを液化度の低い澱粉（DE3以下）に作用させると、希薄濃度10%以上の高濃度反応においても88-90%の極めて高い収量でマルトースを得ることができるが、残る10-12%のうち、マルトトリオースなどの三糖類が5-7%、三糖類より上のオリゴ糖が2-5%の量で未分解物として残り、そしてグルコースはわずか0-0.2%であることが明らかとなつたのである。このような三糖類以上のオリゴ糖が多量混在すれば、マルトースの結晶化は阻害され、ひいてはマ

特開昭52-7487 (2)
分解する。その後、このような酵素は、エセリン・インタメディア〔上田他、*Applied Microbiology*, 第15巻、第492頁（1967）〕やストレプトマイセス・ミテス〔上田他、*Journal of Fermentation Technology*, 第49巻、第552頁（1971年）〕などの微生物によつても生産されることが報告されている。

このように、 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを別々に生産することは多くの文献に報告されているが、 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを同時に生産する微生物については全く報告されていない。

本発明者は、先に、マルトースの生産性を高めるために、 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを同時に生産させることができれば、これを複合酵素として分離し、マルトースの生産にきわめて有用な酵素になり得るとの見地から、 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを同時に生産することのできる菌を求めて探索したところ、バチルス属に属するものと認められる一菌株が β -

ルトースの商品価値を低下せしめることになる。その理由について明らかではないが、現在、これは本発明で使用するバチルス属菌の生産する β -アミラーゼのマルトトリオースの分解活性が小さく、またマルトトリオースの加水分解がマルトースによつて拮抗的に阻害されること、および本発明で使用する β -アミラーゼおよび α -1,6-グルコシダーゼがいずれもexo型の加水分解様式をとるためであろう考えられるのである。

そこで、本発明者はこのマルトトリオースとオリゴ糖を高濃度のマルトースの存在下でもマルトースに効果的に加水分解する酵素の探索をおこなつた結果、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）などのアスペルギルス属菌の生産する α -アミラーゼ、例えばタカアミラーゼAが極めて特異的に作用し、ほぼ理論的収量でマルトースが得られることがわかつた。そして、バチルス・ズブチルス（*Bacillus subtilis*）の液化型 α -アミラーゼや好熱性バチルス属の生産する耐熱性 α -アミラーゼ（大和化成製サーモア

ミラーゼやノボ製サームル)やその他の微生物、
 植物、植物起源の α -アミラーゼでは効果が認め
 られないことも明らかとなつた。第1試は液化澱
 粉をバチルス・セレウス・バリエータス・ミコイ
 デス(*Bacillus cereus* var. *mycoides*)の
 生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダ
 ーゼで加水分解して得られた糖液の糖組成と、こ
 れを一旦加熱処理して酵素を失活させてのち、ア
 スペルギルス・オリゼの α -アミラーゼ、バチ
 ルス・ズブチルスの α -アミラーゼ、好熱性バチ
 ルス属の生産する α -アミラーゼで処理した反応
 液の糖組成を示している。表から明らかな様にア
 スペルギルス・オリゼの α -アミラーゼで処理
 することによりマルトトリオースおよびオリゴ糖
 が効果的に加水分解され、マルトースの収量が4
 ～6%増加し、94～95%の理論的収量で得ら
 れることがわかつた。

表 1

処 理	グルコース (%)	マルトース (%)	三 糖 (%)	三糖以上 のオリゴ糖 (%)
α -アミラーゼの濃縮 対 照 (本処理)	0.1	87.2	7.6	5.1
アスペルギルス属 α -アミラーゼ (タカアミラーゼA)	4.9	94.1	0.4	0.7
バチルス・ズブチルス α -アミラーゼ	1.0	87.3	8.0	3.7
好熱性バチルス属 α -アミラーゼ (サーモフィララーゼ)	0.3	87.4	8.7	3.6

本発明は、これら知見にもとづいてなされたものである。

すなわち、本発明は澱粉または液化澱粉をバチルス属の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼで処理してのち、アスペルギルス属の生産する α -アミラーゼで処理することを特徴とするマルトースの製造方法に関するものである。

アスペルギルス属 α -アミラーゼによる処理は、糖化液に残存する酵素(バチルス属 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼ)を失活させておこなうのが望ましい。

本発明において使用されるバチルス属細菌の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼは以下に示す様な酵素の性質を有する。

A. 本発明により生産される β -アミラーゼの理化学的性質：

- (1) 作用：澱粉、アミロース、アミロペクテン、グリコーゲン、デキストリンなどからマルトースを生成する。
- (2) 基質特異性：アミロースに対する分解はほぼ

100%、澱粉に対する分解率はほぼ60%である。

しかし、アミロペクテン、グリコーゲン、デキストリン、フルランなどに含まれる α -1,6-グリコシド結合を分解することはできない。

- (3) 作用pH範囲：pH 3～10
- (4) 最適作用pH：pH 7付近
- (5) 作用温度：約65℃まで
- (6) 最適作用温度：約50℃
- (7) 失 活：55℃、10分間の加熱で約20%失活し、70℃、10分間の加熱でほぼ完全に失活する。本酵素はpH 6～10の酸性側よりも、むしろアルカリ性側で安定である。
- (8) 阻 害：本酵素はp-クロロマーキュリベンゾエートで阻害されるが、モノヨード酢酸による阻害は少ない。p-クロロマーキュリベンゾエートによる失活は、システインの添加により回

1,6結合を分解する。

- (2) 基質特異性：本酵素は、プルランの α -1,6-グリコシド結合を加水分解してマルトトリオースを生成するが、アミロペクチンやグリコーゲンに作用させても灰度反応の増加は認められない。したがって、本酵素はアミロペクチンが β -アミラーゼ(α -1,4-グルカンマルトヒドロラーゼ)によつてある程度加水分解され、側鎖が短くなつたものに作用すると考えられる。しかし、イソマルトースに対する作用は認められない。

- (3) 作用 pH 範囲：pH 5~10
 (4) 最適作用 pH 範囲：pH 6~6.5
 (5) 作用 温度：約 65℃まで
 (6) 最適作用 温度：約 50℃
 (7) 失 活：本酵素は 50℃、10 分間の加熱で約 50%失活し、65℃、10 分間の加熱でほぼ完全に失活する。しか

復する。本酵素は Cu^{++} 、 Hg^{++} 、 Ag^{+} によつても強く阻害される。また、 Fe^{++} によつても阻害される。

- (9) 精製方法：培養液から、硫酸 30~50%飽和で沈澱する区分として分画され、このあとセフアデックス G-100 カラムクロマトグラフィーにより高濃度に精製された該酵素を得ることができる。

- (10) 力価測定法：2%可溶性澱粉を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に適量の酵素液を加え、蒸留水で全量 4 ml とし、40℃で反応させた。

この条件で、反応時間 1 時間および反応液 1 ml 当り、1 時間のマルトースを生成する酵素量を 1 単位とした。

- B. 本発明により生産される α -1,6-グルコシターゼの理化学的性質：

- (1) 作 用： β -アミラーゼの作用によつてある程度分解されたアミロペクチンの α

し、 Ca^{++} 、あるいは Sr^{++} は強い保護作用があり、 Ca^{++} が存在しないときは、50℃、30 分間の加熱で、約 90%失活するが、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ の CaCl_2 が存在したときは殆んど失活が認められない。

- (8) 安定 pH：本酵素の安定 pH はほぼ 7~9 の間にあり緩性側で不安定で、アルカリ側で比較的安定である。

- (9) 阻 害：本酵素は、p-クロロマーキュリベンゾエートによつて阻害されるが、モノヨード酢酸によつては殆んど阻害されない。p-クロロマーキュリベンゾエートによる阻害はシステインの添加により回復する。本酵素は Hg^{++} 、 Ag^{++} によつては強く阻害され、また Fe^{++} によつても阻害される。

- (10) 精製方法：本酵素は培養液から、硫酸 60~70%飽和で沈澱区分として分画され、そのあとセフアデックスクロマ

トグラフィーにより高濃度に精製された該酵素を得ることができる。

- (11) 力価測定法：本酵素の活性測定は、本酵素がプルランに作用して、マルトトリオースを生成するところから、プルランを基質とする下記の反応条件により活性を測定した。

1%プルランを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml に、適量の酵素液を加え、蒸留水で全量 1.0 ml とし、40℃で 1 時間反応させた。

この条件で 1 時間のマルトトリオースを生成する酵素量を 1 単位とした。

以上の理化学的性質、特に基質特異性から、本酵素は従来知られているイソアミラーゼやプルランナーゼのいずれにも分類されないバチルス属の生産する新規な α -1,6-グルコシダーゼと認められるものである。

上記酵素を生産するのに使用する菌は、バチルス属に属する β -アミラーゼ及び α -1,6-グル

コシダーゼ同時生産菌であるが、その例示菌としては、先に分離されたバチルス・セレウス・グアリエータス・ミコイデス FERM-P 底 2391 をあげることができる。その通学的性質は次に示される。

バチルス・セレウス・グアリエータス・ミコイデス FERM-P 底 2391 の通学的性質、

- (1) 形態 桿菌 (0.9~1.4 μ × 2.0~4.5 μ)
培養初期は主として長鎖で、カビまたは放線菌の増殖のもつれたような形態をとり、培養中期および終期には短鎖状のものが多くなる。非運動性、鞭毛なし、孢子ノウのはつきりしたふくらみは認められない。グラム陽性。
- (2) 肉汁液体培養、生育良好、沈降、こん膜および菌膜の形成認められない。
- (3) 肉汁寒天斜面培養、生育良好、乱糸状に生育、乳白色。
- (4) グルコース・アスパラギン寒天培養、生育よくない。乱糸状に生育。
- (5) グルコース・ナイトレース寒天培養、生育しないか、わずかに生育。

(20) 最適生育温度、30~37℃

最高生育温度、41~45℃

死滅温度、100℃、10分間加熱しても死滅しない。

以上の通学的性質について、バージェーのマニュアル・オブ・デタミネーティブ・バクテリオロジー第7版を参照し、バチルス・セレウス・グアリエータス・ミコイデス (*Bacillus cereus* var. *mycoides*) と同定されるべき微生物であることを認めた。そして、本菌株は破工研菌第2391号として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

このほか、バチルス・スベシス Y T-底 1002 およびバチルス・スベシス Y T-底 1003 も使用することができる。

上記の β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを用いて澱粉を加水分解するには、次の様にしておこなわれる。

澱粉濃度が低い場合には澱粉をそのまま糊化して使用できるが、高濃度の澱粉濃度で反応をおこ

(6) チロシン寒天斜面培養、生育良好、乱糸状、わずかに褐色。

(7) クエン酸の利用、陽性。

(8) ミルク培養、ペプトン化。

(9) ポテト培養、生育良好、乳白色またはわずかに褐色。

(10) セラチン、液化する。

(11) アセチルメチルカルビニールの生産、陽性

(12) 硝酸塩の還元、陽性

(13) カタラーゼ反応、陽性

(14) インドールの生産、陽性

(15) 澱粉の加水分解、陽性

(16) アンモニアの生成、陽性

(17) 硫化水素の生成、陽性

(18) 食塩肉汁、食塩4%以上で生育しない。

(19) 炭水化物の利用、グルコース、マンノース、マルトース、トレハロース、澱粉、グリコーゲンを利用し、生酸する。ガスの生成なし。
シクロロース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、イヌリンも利用する。

なうには、澱粉を物理的方法または酸、酵素を使用する化学的方法で部分的に加水分解して液化澱粉を調製し、これに上記のバチルス属の生産する β -アミラーゼおよび α -1,6-グルコシダーゼを添加して、pH 5.5~7、温度 45~55℃ で反応をおこなう。

反応終了後の糖液は通常これを一旦加熱処理して両酵素を失活させてのち、アスペルギルス属の α -アミラーゼを添加し、pH 5~7、温度 45~60℃ で反応をおこなう。あるいは活性炭など適当な吸着剤またはイオン交換体などに吸着不溶化した酵素を用いて連続的に処理する。

ここに用いるアスペルギルス属の α -アミラーゼは、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オクラセウス、アスペルギルス・ウサミ等アスペルギルス属の菌の生産する α -アミラーゼであればいかなるものでも三糖類以上のオリゴ糖をマルトースとグルコースに分解する能力を有している。

次に実施例により本発明の詳細を説明する。

実施例 1

ミルクカゼイン 2%, 可溶性澱粉 0.5%,
 K_2HPO_4 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, $CaCl_2$
 5×10^{-4} モルからなる培地に、バチルス・セレウ
 ス・パリエータス・ミコイデス（微工研菌第
 2391号）を接種し、30℃で通気培養してβ-
 アミラーゼとα-1,6-グルコシダーゼを生産し、
 硫酸分画とケイソウ土吸着溶出法により両酵素を
 分離した。可溶性澱粉（DE 1.5）10gに、上
 記バチルス属β-アミラーゼ約3000単位とα-
 1,6-グルコシダーゼ約300単位を加え全量100
 mlとしpH6~6.5、温度50℃で反応させた。反
 応終了後（115時間目）、糖組成を分析した結
 果、マルトース88.5%、マルトリオースなど
 三糖類7.6%三糖類以上のオリゴ糖3.8%、グル
 コース0.1%であった。

この糖液の一部10mlを100℃で5分間加熱し
 て酵素を熱失活させ、冷却後アスベルギルス・オ
 リーゼのα-アミラーゼ（三共製薬製、タカアミ
 ラーゼA）300単位を加え、50℃で20時間反

1.4結合以外の結合）のある糖であると思われる。

なお、糖化終了後の糖化液を加熱処理しないで、
 バチルス属β-アミラーゼとα-1,6-グルコシ
 ダーゼの存在下でアスベルギルス・オリーゼのα
 -アミラーゼで処理した場合の糖組成は、マルト
 ース90.5%、グルコース2.0%、三糖類4.2%
 と三糖類以上のオリゴ糖3.3%であった。

実施例 2

可溶性澱粉（DE 1.5）1gに、実施例1によ
 り得られたバチルス属β-アミラーゼ300単位と
 α-1,6-グルコシダーゼ300単位を加え、全量
 10mlにして、pH6~6.5、温度50℃で反応さ
 せた。20時間反応後、マルトースとしての分解
 率が96%に達してのち、アスベルギルス属α-
 アミラーゼ（三共製薬製、タカアミラーゼA）
 300単位を加え、同じ条件で反応させた。反応終
 了後、糖組成を分析した結果、マルトース91.7
 %、グルコース3.1%、三糖類2.1%、三糖類以
 上のオリゴ糖3.1%であった。

応させた。そして糖組成を分析した結果、第2表
 に記す通りであった。

第 2 表

糖 組 成	アスベルギルス・オリーゼのα-アミラ ーゼにより	
	処理をしたもの	処理をしていないもの
グルコース	4.7	0.1
マルトース	94.2	88.5
三 糖 類	0.4	7.6
三糖類以上のオリゴ糖	0.7	3.8

ここで、アスベルギルス属のα-アミラーゼ1
 単位は、可溶性澱粉を基質とし、pH5.5、温度
 37℃で1分間に1μMのマルトースを生成する
 酵素量と定義した。

この表から明らかな様に、マルトリオースお
 よびオリゴ糖は効果的に分解され、糖化液のマル
 トース含量は94.2%であった。残存する三糖類
 および三糖類以上のオリゴ糖は、いずれも1%以
 下であった。これらの糖はいずれも分岐（α-

5.添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 通
~~特 許 要 領 書 1 通~~
 (2) 特 許 関 本 1 通

と字削除

PREPARATION OF HIGH-PURITY MALTOSE

Publication Number: 52-007487 (JP 52007487 A), January 20, 1977

Inventors:

- TAKASAKI YOSHIYUKI

Applicants

- AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL (A Japanese Government or Municipal Agency), JP (Japan)

Application Number: 50-082595 (JP 7582595), July 04, 1975

International Class (IPC Edition 2):

- C12D-013/00

JAPIO Class:

- 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY--- Microorganism Industry)

JAPIO Keywords:

- R113 (CHEMISTRY--- Pullulam Polysaccharides)

Abstract:

PURPOSE: High-purity maltose is obtained in high yield by glucolized starch with enzymes produced by bacillus, followed by decomposition of maltotriose and oligomaltose in siad glucolized starch. (From: *Patent Abstracts of Japan*, Section: C, Section No. 12, Vol. 01, No. 48, Pg. 141, May 11, 1977)

JAPIO

© 2004 Japan Patent Information Organization. All rights reserved.
Dialog® File Number 347 Accession Number 048487